



(51) 国際特許分類7 G01N 31/00, C12Q 1/527	A1	(11) 国際公開番号 WO00/34771 (43) 国際公開日 2000年6月15日(15.06.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06847 (22) 国際出願日 1999年12月7日(07.12.99) (30) 優先権データ 特願平10/347003 1998年12月7日(07.12.98) JP 特願平11/84035 1999年3月26日(26.03.99) JP 特願平11/147848 1999年5月27日(27.05.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.)(JP/JP) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 海老沼宏幸(EBINUMA, Hiroyuki)(JP/JP) 牛澤幸司(USHIZAWA, Koji)(JP/JP) 〒301-0852 茨城県竜ヶ崎市向陽台3-3-1 第一化学薬品株式会社 診断薬研究所内 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 松井 茂(MATSUI, Shigeru) 〒104-0061 東京都中央区銀座8丁目16番5号 銀座森ビル7階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR DETERMINATION OF HYDROGEN SULFIDE OR SULFIDE ION AND METHOD FOR DETERMINATION OF SPECIFIC SUBSTANCE UTILIZING SAID METHOD (54)発明の名称 硫化水素又は硫化物イオンの定量法及びそれを利用した特定物質の定量法 (57) Abstract A method for determination of hydrogen sulfide or sulfide ion which comprises providing a sample containing hydrogen sulfide or sulfide ion, adding, to the sample, a metal ion or a compound capable of liberating the metal ion and a metal indicator which reacts with the metal ion to thereby undergo a coloring reaction such that the reaction is inhibited or promoted by hydrogen sulfide or sulfide ion mentioned above, and measuring the strength of coloration caused by the metal indicator. The method can be used for determining the hydrogen sulfide or sulfide ion contained in such a sample with ease and high sensitivity. Also provided is a method for determination of a specific substance which comprises adding, to the specific substance, a component which react with the specific substance to thereby generate hydrogen sulfide or sulfide ion, a metal ion or a compound capable of liberating the metal ion and a metal indicator which reacts with the metal ion to thereby undergo a coloring reaction such that the reaction is inhibited or promoted by hydrogen sulfide or sulfide ion mentioned above, and measuring the strength of coloration caused by the metal indicator.		

硫化水素又は硫化物イオンを含有する試料に、金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬とを添加し、該金属指示薬による発色強度を測定することにより、前記試料中の硫化水素又は硫化物イオンを簡便かつ感度よく定量する方法を提供する。また、特定物質を含む試料中に、該特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分と、金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬とを添加し、該金属指示薬による発色強度を測定することにより、前記特定物質を定量する方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RJ	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BJ	ベナン	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	CR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー		共和国	TR	トルコ
CC	コンゴ	ID	インドネシア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	IE	アイルランド	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	IN	インド	MW	マラウイ	US	米国
CN	中国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CU	キューバ	JP	日本	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	KE	ケニア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

硫化水素又は硫化物イオンの定量法及びそれを利用した特定物質の定量法

技術分野

本発明は、硫化水素又は硫化物イオンによる金属イオンと金属指示薬との錯体形成の促進又は阻害反応を利用することにより、試料中の硫化水素又は硫化物イオンを簡便かつ感度よく定量する方法、及び試料中の特定物質から硫化水素を発生させ、その硫化水素又はそれに由来する硫化物イオンを前記定量法により測定して、該特定物質を簡便かつ高感度に定量する方法に関する。

背景技術

硫黄は、自然界で重要な役割を担う元素の1つである。特に含硫アミノ酸であるシステインやメチオニンの構成成分としての役割は大きい。また、植物と動物との間で大きな硫黄循環がなされていることも知られている。植物では硫黄を硫酸イオンの形で取り込み、硫化物イオンまで還元した後、システイン合成が行われ、さらにメチオニン合成へと続く。動物では食物連鎖によりメチオニンを食物から摂取し、生体内でシステインに代謝される。この代謝過程で中間体としてホモシステインが生成される。

ホモシステインは、正常時にはほとんど存在しない中間代謝物であるが、その血液中濃度が高値となると、冠動脈疾患や脳卒中の発生率が高くなるという報告がなされている。このため、血液中のホモシステイン量が、心筋梗塞や脳梗塞などの血栓塞栓症、あるいは動脈硬化症の発生を予知するのに役立つリスクファクターとして認められつつある。

また、システインは、メチオニンの代謝により生成するアミノ酸であることから、ホモシステイン代謝異常の原因把握の補助的な指標とも成り得る。

更に、ホモシステイン又はシステインに作用して分解又は置換を行い、硫化水

素を生成する作用をもつ酵素も知られている。しかしながら、このような酵素を利用してホモシステイン又はシステインを定量しようとしても、発生した硫化水素を簡便かつ感度よく測定する方法がないため、上記酵素をホモシステイン又はシステインの定量に用いる実用的な方法は未だ見出されていない。

一方、硫化水素又はそれに由来する硫化物イオンは、大気汚染や河川の水質汚染など環境汚染の指標としても重要なものであり、それらの試料中の硫化水素又はそれに由来する硫化物イオンを測定することで汚染状況を確認できる。

硫化水素又はそれに由来する硫化物イオンの従来の測定方法は、例えば、発色化合物を利用した方法として、2, 2'-ジピリジルジスルファイド (Svenson, Anal. Biochem., 107; 51-55 (1980)) や、ニトロプルシッドナトリウムを用いる方法、強酸性下で、N, N-ジメチル-P-フェニレンジアミンと、塩化第二鉄とを作用させて、メチレンブルーを生成させ、青色発色を検出する方法 (メチレンブルー法)、セレンウムを触媒として色素 (トルジンブルーやメチレンブルー) の退色量及び速度を測定する方法 (Mousavi 等, Bull. Chem. Soc. Jpn, 65; 2770-2772 (1992)、Gokmen 等, Analyst, 119; 703-708 (1994)) などが知られている。しかしながら、いずれの場合も簡便性や感度面で十分な方法とは言い難かった。

発明の開示

したがって、本発明の1つの目的は、より簡便で高感度な、硫化水素又は硫化物イオンの定量法を提供することにある。本発明のもう1つの目的は、試料中の特定物質から硫化水素を発生させ、その硫化水素又はそれに由来する硫化物イオンを前記定量法により測定して、該特定物質を簡便で高感度に定量する方法を提供することにある。

本発明者らは、上記目的を達成するため、鋭意研究した結果、硫化水素又は硫化物イオンが、金属イオンと金属指示薬の発色反応を阻害もしくは促進する作用を利用することにより、試料中の硫化水素又は硫化物イオンを簡便かつ高感度に

定量できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明の1つは、硫化水素又は硫化物イオンを含有する試料に、金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬とを添加し、該金属指示薬による発色強度を測定することを特徴とする硫化水素又は硫化物イオンの定量法を提供するものである。

本発明のもう1つは、特定物質を含む試料中に、該特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分と、金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬とを添加し、該金属指示薬による発色強度を測定することを特徴とする特定物質の定量法を提供するものである。

本発明によれば、硫化物イオンによる、金属イオンと金属指示薬との錯体形成の促進又は阻害反応を利用することにより、簡便かつ感度よく硫化水素又は硫化物イオンを定量することができる。また、特定物質を含む試料中に、該特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分を作用させて生成した硫化水素を、上記反応を利用して測定することにより、試料中の特定物質を簡便かつ感度よく定量することができる。

図面の簡単な説明

図1は、発色阻害法による硫化物イオンの定量結果を示す図である。

図2は、発色促進法による硫化物イオンの定量結果を示す図である。

図3は、発色促進法によるホモシステインの定量結果を示す図である。

図4は、発色促進法によるシステインの定量結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の硫化水素又は硫化物イオンの定量法において、硫化水素又は硫化物イ

オンが、金属イオンと金属指示薬との発色反応を阻害する作用を利用する場合について説明すると、次の通りである。すなわち、試料中に存在する硫化水素又は硫化物イオンと金属イオンとを接触させて硫化金属を生成させると共に、金属イオンと金属指示薬とを反応させてその発色強度を測定することにより、金属イオンと金属指示薬との反応による錯体生成量を求める。そして、硫化水素又は硫化物イオンが存在しない以外は上記と同じ条件下で、金属イオンと金属指示薬とを反応させた場合の錯体生成量から、上記錯体生成量を差し引くことにより、上記硫化金属が錯体生成を起こさない性質により錯体生成量が減少した量を求める。この錯体生成量が減少した量は、試料中に存在する硫化水素又は硫化物イオンに相応した量となる。したがって、上記錯体生成量の減少量に基づいて、試料中の硫化水素又は硫化物イオンの含量を算出することができる。

また、硫化水素又は硫化物イオンが、金属イオンと金属指示薬との発色反応を促進する作用を利用する場合について説明すると、次の通りである。すなわち、硫化水素又は硫化物イオンを含有する試料中に、金属イオンと金属指示薬とを添加し反応させて、その発色強度を測定することにより、金属イオンと金属指示薬との反応による錯体生成量を求める。そして、この錯体生成量から、硫化水素又は硫化物イオンが存在しない以外は上記と同じ条件下で、金属イオンと金属指示薬とを反応させた場合の錯体生成量を差し引くことにより、錯体生成量の増加量を求める。この錯体生成量の増加量は、硫化水素又は硫化物イオンが、金属イオンと金属指示薬との反応を促進することによってもたらされたものであるから、硫化水素又は硫化物イオンに相応した量となる。したがって、この錯体生成量の増加量に基づいて、試料中の硫化水素又は硫化物イオンの含量を算出することができる。

本発明において、金属イオンは、硫化水素又は硫化物イオンによって金属イオンと金属指示薬の発色反応を阻害もしくは促進するものであれば特に限定されないが、金属イオンと金属指示薬との発色反応を阻害するものとしては、亜鉛イオンが好ましく使用され、上記発色反応を促進するものとしては、2価又は3価の

鉄イオンが好ましく使用される。具体的には、上記金属の塩酸塩、硫酸塩、酢酸塩などが使用されるが、水溶液に溶解して遊離の金属イオンを生成するものであれば特に制限されない。

本発明で用いられる金属指示薬としては、硫化水素又は硫化物イオンによって上記金属イオンとの発色反応を阻害もしくは促進される物質であれば特に限定されないが、その錯体形成時の発色感度が高いものが好ましく、例えばピリジルアゾ化合物や、ニトロソアミノフェノール化合物などが好ましく利用される。さらに具体的には、ピリジルアゾ化合物としては、2-(5-ブロモ-2-ピリジルアゾ)-5-[N-N-プロピル-N-(3-スルフォプロピル)アミノ]フェノール・ナトリウム塩(商品名: 5 Br · PAPS、以下、5 Br · PAPSと略記する)や、2-(5-ニトロ-2-ピリジルアゾ)-5-[N-N-プロピル-N-(3-スルフォプロピル)アミノ]フェノール・ナトリウム塩(商品名: Nitro · PAPS)が好ましく用いられる。また、ニトロソアミノフェノール化合物としては、2-ニトロソ-5-[N-N-プロピル-N-(3-スルフォプロピル)アミノ]フェノール(商品名: Nitroso · PSAP)や、2-ニトロソ-5-[N-エチル-N-(3-スルフォプロピル)アミノ]フェノール(商品名: Nitroso · ESAP)が好ましく用いられる。これらは、水溶性であり、亜鉛イオン、銅イオン、コバルトイオン、鉄イオンなどと錯体を形成して、高感度に発色する性質を有する。これらの金属指示薬としては、様々な特徴を持ったものが市販されており、例えば株式会社同仁化学研究所より入手できる。

本発明における特定物質とは、酵素反応などによって硫化水素又は硫化物イオンが生成されるものであればいずれでもよく、好ましくはホモシステインやシステインなどが挙げられる。

特定物質をホモシステインとした場合、特定物質から硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分としては、ホモシステインに作用して硫化水素又は硫化物イオンを生成する作用を有する酵素(E1)が用いられる。このような酵素として

は、例えばL-メチオニン γ -リアーゼ（酵素番号ECクラス4. 4. 1. 1）や、*o*-アセチルホモセリン-リアーゼ（酵素番号ECクラス4. 2. 9）などが挙げられるが、特に*o*-アセチルホモセリン-リアーゼが好ましく用いられる。

L-メチオニン γ -リアーゼは、チオール化合物非存在下ではホモシステインに対して分解（脱離）作用を示して硫化水素を発生するが、チオール化合物存在下では γ -置換反応を触媒する作用を有する酵素として知られている。この酵素は、それを産生する微生物、例えばシュードモナス属の細菌から得ることができるが、市販されているものもあり、例えば和光純薬株式会社等から入手することができる。

また、*o*-アセチルホモセリン-リアーゼは、アミノ酸合成作用（例えば、*o*-アセチルホモセリンと硫化水素からはホモシステインが、メタンチオールからはメチオニンが生成する作用）を有する酵素として知られている（「酵素ハンドブック」、丸尾ら監修、朝倉書店、1982年参照）。本発明者らは、*o*-アセチルホモセリン-リアーゼをチオール化合物存在下でホモシステインに作用させると、 γ -置換反応により硫化水素を生成する触媒作用を新たに見出した（特願平10-347003号）。

o-アセチルホモセリン-リアーゼは、それを産生する様々な微生物が知られており（例えば、Ozaki 等, J. Biochem 91; 1163-1171 (1982)、Yamagata, J. Biochem 96:1511-1523 (1984)、Brzywczy 等, Acta. Biochimica. Polonica 40 (3) ; 421-428 (1993) 参照）、これらの微生物を培養することにより得ることができるが、市販されているものもあり、例えばユニチカ株式会社等から入手できる。これらの酵素（E1）は、ホモシステインに強く反応するとともに、システインにも若干作用して硫化水素を生成する作用を有する。

ユニチカ株式会社製のバチルス属由来の*o*-アセチルホモセリン-リアーゼ（商品名「GCS」）の理化学的性質は次の通りである。なお、下記理化学的性質のうち、分子量以外の項目は、本発明者らにより求めたものである。

< 理化学的性質 >

1) 作用: L-ホモシステインとチオール化合物の γ 置換反応を触媒し、硫化水素及びチオール化合物置換ホモシステインを生成する。また、L-メチオニンとチオール化合物の置換反応を触媒し、メタンチオール及びチオール化合物置換ホモシステインを生成する。

2) 基質特異性: L-ホモシステイン、L-メチオニンに作用する。また、L-システインには β 置換反応として若干反応する。

3) 分子量: 180,000 (ゲル濾過法)

4) 至適pH: 8.5~9.0

5) Km: 0.9mM (L-ホモシステイン)

また、特定物質をシステインとした場合、特定物質から硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分としては、システインに作用して硫化水素又は硫化物イオンを生成する作用を有する酵素(E2)が用いられる。このような酵素としては、例えば、 α -アセチルセリン-リアーゼや、 β -シアノアラニンシンターゼや、システインリアーゼなどが挙げられるが、特に α -アセチルセリン-リアーゼが好ましく用いられる。

α -アセチルセリン-リアーゼは、システイン合成作用(α -アセチルセリンと硫化水素からシステインを生成する作用)を有する酵素として知られている。本発明者らは、 α -アセチルセリン-リアーゼをチオール化合物存在下でシステインに作用させると、 β -置換反応により硫化水素を生成する触媒作用を新たに見出した(特願平11-84035号公報)。この作用はシステインに特異的である。 α -アセチルセリン-リアーゼは、それを産生する微生物(例えば、Burnell 等, Biochim. Biophys. Acta 481; 246-265 (1977)、Nagasaw 等, Methods Enzymol 143; 474-478 (1987))や植物(例えば、Droux 等, Arch. Biochem. Biophys. 295(2); 379-390 (1992)、Yamaguchi 等, Biochim. Biophys. Acta 1251; 91-98 (1995))等より得ることができる。

例えば、Yamaguchi 等, Biochim. Biophys. Acta 1251; 91-98 (1995) に記

載された方法により、ハウレンソウから得た α -アセチルセリン-リアーゼの理化学的性質は次の通りである。なお、下記理化学的性質のうち、分子量以外の項目は、本発明者らにより求めたものである。

< α -アセチルセリン-リアーゼの理化学的性質>

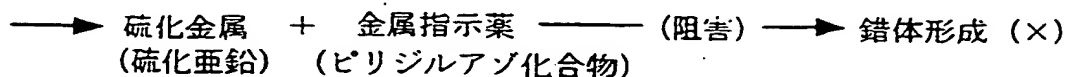
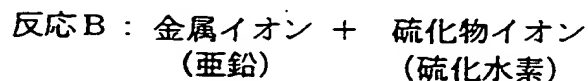
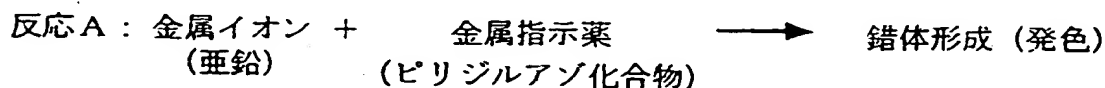
- 1) 作用：L-システインとチオール化合物の β 置換反応を触媒し、硫化水素及びチオール化合物置換システインを生成する。
- 2) 基質特異性：L-システインに特異的に作用する。
- 3) 分子量：63,000 (ゲル濾過法)
- 4) 至適pH：9.0～11.0
- 5) Km：0.27mM (L-システイン)

一方、 β -シアノアラニンシンターゼは、シアン存在下でシステインに作用させると β -置換反応により硫化水素を生成する触媒作用を示し、また、システインリアーゼは、亜硫酸イオン存在下で、システインに作用させると β -置換反応により硫化水素を生成する触媒作用を有することが知られている。

なお、本発明で用いられるチオール化合物は、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンなど、置換反応が行えるものであれば特に制限なく、好適なものとしては、2-メルカプトエタノールやシステアミンが挙げられる。

本発明の硫化水素もしくは硫化物イオンの測定方法における反応を式で示すと下記化学式1及び化学式2のように表すことができる。

<化学式1>



<化学式 2>

反応C： 金属イオン + 金属指示薬 — (反応しない) — 錯体形成 (×)
 (鉄) (ピリジルアゾ化合物又は
 ニトロソアミノフェノール化合物)

反応D： 金属イオン + 硫化物イオン + 金属指示薬
 (鉄) (硫化水素) (ピリジルアゾ化合物又は
 ニトロソアミノ
 フェノール化合物)
 ———— (反応促進) ————— 錯体形成 (発色)

上記化学式1において、反応Aは、硫化物イオン非存在下において、金属イオン（例えば、亜鉛イオン）と金属指示薬（例えば、ピリジルアゾ化合物）は速やかに錯体を形成し発色することを示す。

そして、反応Bは金属イオン（例えば、亜鉛イオン）と硫化物イオンを予め接触させて硫化金属（例えば、硫化亜鉛）を生成させることにより、生成した化合物（硫化亜鉛）が金属指示薬と錯体を形成できなくなり、その分の発色値が減少することを示す。したがって、その発色値の減少分を算出することにより、硫化水素もしくは硫化物イオンを測定することができる。

すなわち上記化学式1においては、硫化物イオンと反応して安定な硫化金属を形成する金属イオンと、該金属イオンと速やかに錯体を形成する金属指示薬の組合せを選択することが重要である。このような金属イオンと金属指示薬との組合せとしては、例えば亜鉛イオンとピリジルアゾ化合物との組合せが挙げられる。以下の説明において、上記化学式1の原理を用いた測定方法を発色阻害法という。

また、上記化学式2において、反応Cは、例えば予め中性～弱アルカリ性（pH 7.0～9.0）の適当な緩衝液中に、金属イオン（例えば、鉄イオン）と金

属指示薬（例えば、ピリジルアゾ化合物又はニトロソアミノフェノール化合物）を共存させることなどにより、該金属イオンと金属指示薬との錯体形成が阻害されて発色が起こらない状態を示す。

そして、反応Dは、そのような条件下で硫化物イオンを添加すると、その錯体形成が硫化物イオン濃度に応じて促進され、その分の発色値が増加することを示す。したがって、その発色値の増加量分を算出することにより、硫化水素もしくは硫化物イオンを測定することができる。

すなわち、上記化学式2においては、金属イオンと金属指示薬が錯体を形成しにくい条件にすることが重要である。このような金属イオンと金属指示薬との組合せとしては、例えば鉄イオンと、ピリジルアゾ化合物又はニトロソアミノフェノール化合物との組合せが挙げられる。以下の説明において、上記化学式2の原理を用いた測定方法を発色促進法という。

上記発色促進法の反応機序を鉄イオンとピリジルアゾ化合物の組合せにて推察すると、次のように考えることができる。

鉄イオンは、水溶液中でアクア錯体やヒドロキソ錯体など様々な形で存在し、それはpH条件などの要因により大きく影響されることが知られている。また、高アルカリ条件下では水酸化物として沈殿形成も行われる。本測定系における鉄イオンとピリジルアゾ化合物の組合せでは、2価及び3価の鉄イオンを予め中性から弱アルカリ性（pH 7.0～9.0）の適当な緩衝液中に共存させることで、溶液中で鉄イオン自体が錯体を形成することにより金属指示薬（ピリジルアゾ化合物）との反応が阻害されと考えられる。特に2価の鉄イオンの場合、上記条件下では錯体形成のほかに酸素による酸化を受けやすく、その結果3価の鉄イオンとして存在しているものと考えられる。そして、この状態の鉄イオンに硫化物イオンが添加共存されると、硫化物イオンの還元力により3価の鉄イオンが2価の鉄イオンに還元されてピリジルアゾ化合物と反応可能な状態となり、発色が認められるものと考えられる。また、金属指示薬によっては3価の鉄イオンと錯体を形成しにくいものもあり、この場合には上述したpH範囲外でもこの促進反応

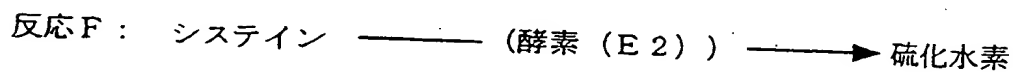
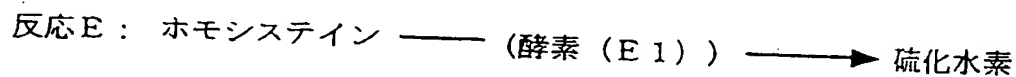
原理を適用することができると考えられる。

すなわち、本発明の発色促進法は、まず、硫化物イオンにより還元を受けて金属指示薬と反応可能になる金属イオンを、例えば金属イオンの溶液を適当な条件とすることで金属指示薬と反応しない状態にする。そして、硫化物イオンを添加することによって、その反応しない状態から反応可能な状態にして、金属指示薬と反応させる方法である。

したがって、本発明の発色促進法は上述したような金属イオンと適当な金属指示薬とを組み合わせることにより達成される。

また、本発明の特定物質をホモシステイン及びシステインとした場合の測定方法における反応を式で示すと下記化学式3のように表すことができる。

<化学式3>



上記化学式3において、反応Eは、ホモシステインに作用して硫化水素を生成する作用を触媒する酵素(E1)(例えば、 α -アセチルホモセリンーリアーゼ)を作用させて硫化水素を生成させることを示す。また、反応Fは、システインに作用して硫化水素を生成する作用を触媒する酵素(E2)(α -アセチルセリンーリアーゼ)を作用させて硫化水素を生成させることを示す。そして、生成した硫化水素を、上記化学式1又は化学式2に示す反応を利用して測定することにより、ホモシステイン及びシステインを定量することができる。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1(発色阻害法による硫化物イオンの定量)

試料及び試薬として以下のものを用いた。

試料：

硫化物イオンとして、硫化ナトリウム（和光純薬社製）を0～100 μ M含む水溶液。

第一試薬：

トリス緩衝液（pH 8.5） 100 mM

塩化亜鉛 10 μ M

第二試薬：

5 Br · PAPS（同仁化学研究所社製） 1 mM

試料50 μ lに第一試薬900 μ lを加え、室温で5分間放置後、第二試薬50 μ lを加えて室温で5分間放置した。その後、550 nmの波長で反応溶液の吸光度を測定した。その結果を図1に示す。

図1の結果から、硫化物イオンの濃度に応じて吸光度の減少が認められ、その関係は定量的であることが分かった。この結果から、金属イオンと金属指示薬との錯体形成の阻害反応を利用することで、硫化物イオンを測定できることが分かった。

実施例2（発色促進法による硫化物イオンの定量）

試料及び試薬として以下のものを用いた。

試料：

硫化物イオンとして、硫化ナトリウム（和光純薬社製）を0～100 μ M含む水溶液。

第一試薬：

トリス緩衝液（pH 8.0） 100 mM

塩化第一鉄 33.3 μ M

2-メルカプトエタノール 4 mM

第二試薬：

5 Br · PAPS（同仁化学研究所社製） 0.25 mM

第三試薬：

EDTA (pH 7.0) 200 mM

試料 20 μ l に第一試薬 600 μ l を加え、37℃で10分間放置後、第二試薬 160 μ l を加えて37℃で5分間放置した。さらに、第三試薬 20 μ l を加え室温にて5分間放置後、550 nmの波長で反応溶液の吸光度を測定した。その結果を図2に示す。

図2の結果から、硫化物イオンの濃度に応じて吸光度の増加が認められ、その関係は定量的であることが分かった。この結果から、金属イオンと金属指示薬との錯体形成の促進反応を利用することで、硫化物イオンを測定できることが分かった。

以下の実施例では、ホモシステインの定量に用いる酵素 (E1) として、パチルス属由来の α -アセチルホモセリンーリアーゼ (商品名「GCS」、ユニチカ株式会社製、以下に記載した力価はメーカー表示値による) を使用し、システイン定量に用いる酵素 (E2) として、 α -アセチルセリンーリアーゼ (ハウレンソウ由来) を使用した。

なお、 α -アセチルセリンーリアーゼは、山口等の方法 (Biochim. Biophys. Acta 1251; 91-98 (1995)) に基づいて調製した。

具体的には、ハウレンソウ葉 2 kg から抽出、イオン交換クロマト、疎水クロマト及びゲル濾過クロマトの工程を経て、約 4,000 単位の酵素を調製して用いた。なお、力価は、同文献に記載の方法により測定した。

実施例3 (発色促進法によるホモシステインの定量)

試料及び試薬として以下のものを用いた。

試料:

L-ホモシスチン (シグマ社製) を 0~50 μ M 含む水溶液 (L-ホモシステインとしては、0~100 μ M)。

第一試薬:

トリス緩衝液 (pH 8.0) 100 mM

塩化第一鉄 33.3 μ M

2-メルカプトエタノール 4 mM

o-アセチルホモセリン-リアーゼ (ユニチカ社製) 3 u/ml

第二試薬:

5 Br · PAPS (同仁化学研究所社製) 0.25 mM

第三試薬:

EDTA (pH 7.0) 200 mM

試料 20 μ l に第一試薬 600 μ l を加え、37℃で10分間放置後、第二試薬 160 μ l を加えて37℃で5分間放置した。さらに、第三試薬 20 μ l を加え、室温にて5分間放置後、550 nmの波長で反応溶液の吸光度測定した。その結果を図3に示す。

図3の結果から、ホモシステイン濃度に応じて吸光度の増加が認められ、その関係は定量的であることが分かった。この結果から、金属イオンと金属指示薬との錯体形成の促進反応を利用することで、ホモシステインを測定できることが分かった。

実施例4 (発色促進法によるシステインの定量)

試料及び試薬として以下のものを用いた。

試料:

L-システイン (シグマ社) を 0 ~ 500 μ M 含む水溶液。

第一試薬:

トリス緩衝液 (pH 8.0) 100 mM

塩化第一鉄 33.3 μ M

2-メルカプトエタノール 4 mM

o-アセチルセリン-リアーゼ (ハウレン草由来) 6 u/ml

第二試薬:

5 Br · PAPS (同仁化学研究所社製) 0.25 mM

第三試薬:

EDTA (pH 7.0) 200 mM

試料 $20\ \mu\text{l}$ に第一試薬 $600\ \mu\text{l}$ を加え、 37°C で 10 分間放置後、第二試薬 $160\ \mu\text{l}$ を加えて 37°C で 5 分間放置した。さらに、第三試薬 $20\ \mu\text{l}$ を加え室温にて 5 分間放置後、 $550\ \text{nm}$ の波長で反応溶液の吸光度を測定した。その結果を図 4 に示す。

図 4 の結果から、システイン濃度に応じて吸光度の増加が認められ、その関係は定量的であることが分かった。この結果から、金属イオンと金属指示薬との錯体形成の促進反応を利用することで、システインを測定できることが分かった。

産業上の利用可能性

以上のように、本発明によれば、試料中の硫化水素又は硫化物イオンを簡便かつ感度よく定量することができ、また、特定物質を含む試料中に、該特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分を作用させて生成した硫化水素を、上記定量法で測定することにより、試料中の特定物質を簡便かつ感度よく定量することができる。したがって、例えば生体試料中のホモシステイン、システインなどの定量法に利用することができる。

請 求 の 範 囲

1. 硫化水素又は硫化物イオンを含有する試料に、金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬とを添加し、該金属指示薬による発色強度を測定することを特徴とする硫化水素又は硫化物イオンの定量法。
2. 前記金属イオンが、亜鉛イオン又は鉄イオンである請求項1記載の硫化水素又は硫化物イオンの定量法。
3. 前記金属指示薬が、ピリジルアゾ化合物又はニトロソアミノフェノール化合物である請求項1記載の硫化水素又は硫化物イオンの定量法。
4. 特定物質を含む試料中に、該特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分と、金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬とを添加し、該金属指示薬による発色強度を測定することを特徴とする特定物質の定量法。
5. 前記金属イオンが、亜鉛イオン又は鉄イオンである請求項4記載の特定物質の定量法。
6. 前記金属指示薬が、ピリジルアゾ化合物又はニトロソアミノフェノール化合物である請求項4記載の特定物質の定量法。
7. 前記特定物質がホモシステインであり、前記特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分が、ホモシステインに作用して硫化水素を生成する作用を有する酵素(E1)である請求項4記載の特定物質の定量法。
8. 前記酵素(E1)が、チオール化合物の存在下で、ホモシステインに対して置換反応を触媒するものである請求項7記載の特定物質の定量法。
9. 前記酵素(E1)が、 α -アセチルホモセリン-リアーゼである請求項8記載の特定物質の定量法。

10. 前記チオール化合物が、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンからなる群より選ばれた1つである請求項8記載の特定物質の定量法。

11. 前記特定物質がシステインであり、前記特定物質に作用して硫化水素又は硫化物イオンを発生させる成分が、システインに作用して硫化水素を生成する作用を有する酵素(E2)である請求項4記載の特定物質の定量法。

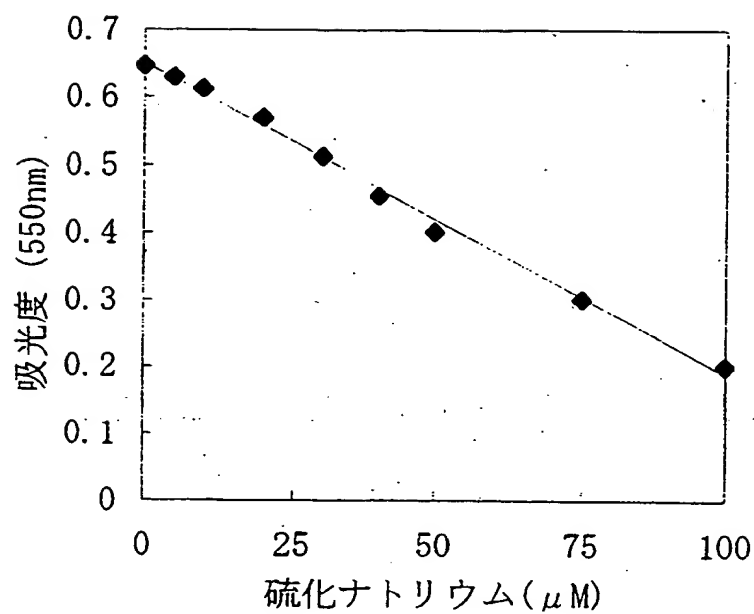
12. 前記酵素(E2)が、チオール化合物の存在下、システインに対して置換反応を触媒するものである請求項11記載の特定物質の定量法。

13. 前記酵素(E2)が、 α -アセチルセリン-リアーゼである請求項12記載の特定物質の定量法。

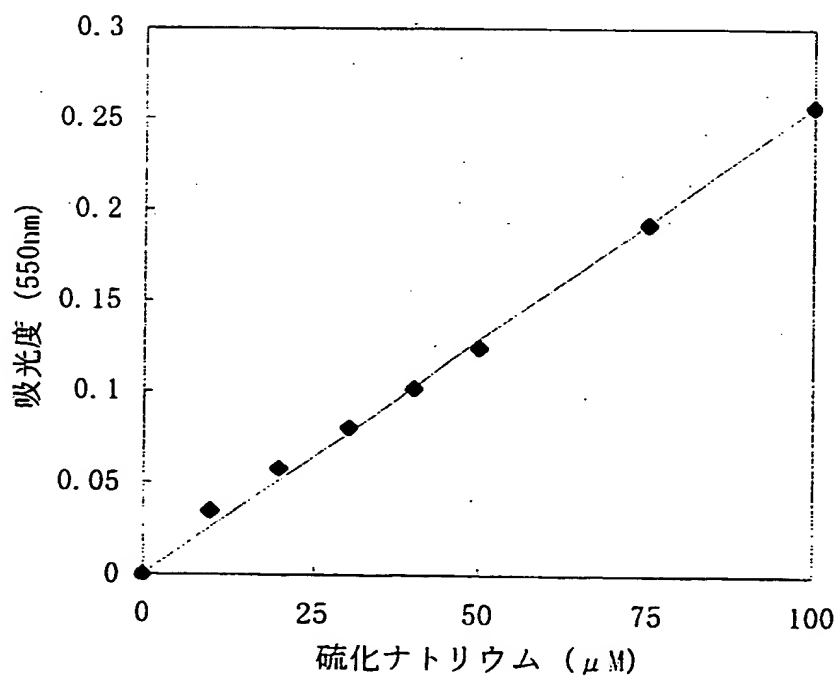
14. 前記チオール化合物が、メタンチオール、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、チオグリセロール、システアミンからなる群より選ばれた1つである請求項12記載の特定物質の定量法。

1 / 2

第1図

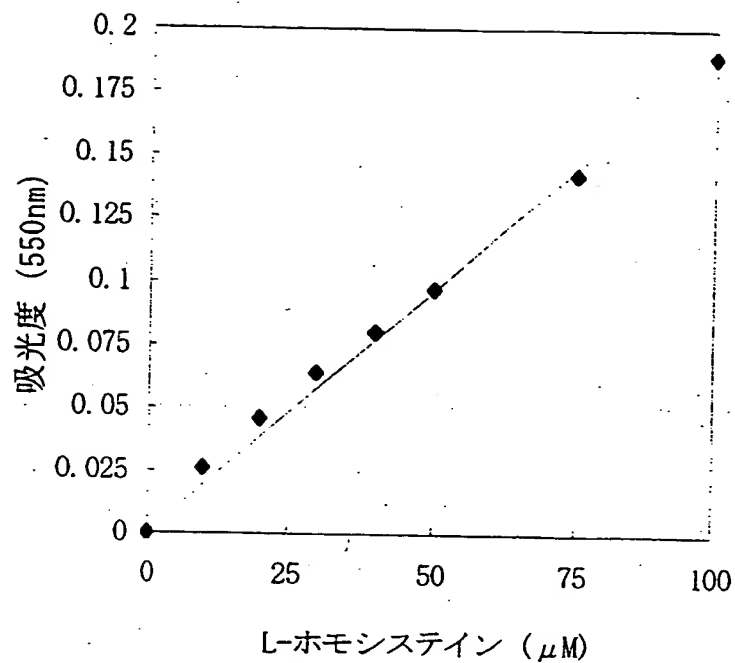


第2図

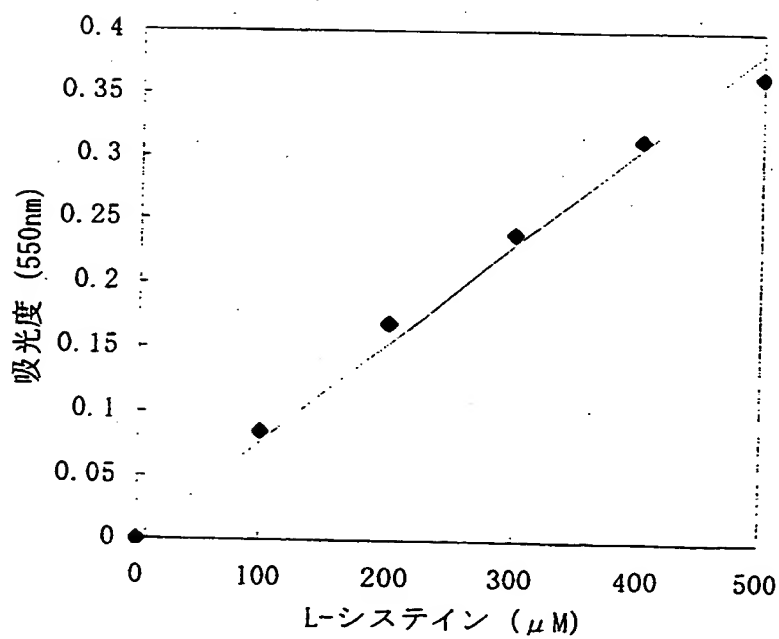


2 / 2

第3図



第4図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06847

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N31/00, C12Q 1/527

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ G01N31/00, C12Q 1/527

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAS, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 54-99494, A (Nippon Yuka Kogyo K.K.), 06 August, 1979 (06.08.79) (Family: none)	1-14
A	JP, 06-160368, A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 07 June, 1994 (07.06.94) (Family: none)	1-14
A	JP, 63-247656, A (Miles Lab. Inc.), 14 October, 1988 (14.10.88) & GB, 2200989, A & GB, 8801876, A & FR, 2610409, A & DE, 3703081, A & CA, 1339797, A	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
29 February, 2000 (29.02.00)

Date of mailing of the international search report
07 March, 2000 (07.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ G01N31/00, C12Q 1/527

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ G01N31/00, C12Q 1/527

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2000年
日本国登録実用新案公報 1994-2000年
日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAS, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 54-99494, A (日本油化工業株式会社) 6. 8月. 1979 (06. 08. 79) ファミリーなし	1-14
A	JP, 06-160368, A (出光興産株式会社) 7. 6月. 1994 (07. 06. 94) ファミリーなし	1-14
A	JP, 63-247656, A (マイルス・インコーポレーテッド) 14. 10月. 1988 (14. 10. 88) & GB, 2200989, A & GB, 8801876, A & FR, 2610409, A & DE, 3703081, A & CA, 1339797, A	1-14

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 02. 00

国際調査報告の発送日

07.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹中靖典



2J

9507

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

M.H
EP

PCT

特許協力条約

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

出願人又は代理人 の書類記号 PCT-DK-2	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP99/06847	国際出願日 (日.月.年) 07.12.99	優先日 (日.月.年) 07.12.98	
出願人(氏名又は名称) 第一化学薬品株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
【PCT36条及びPCT規則70】

出願人又は代理人 の書類記号 PCT-DK-2	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/06847	国際出願日 (日.月.年) 07.12.99	優先日 (日.月.年) 07.12.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl. G01N31/00, C12Q 1/527		
出願人(氏名又は名称) 第一化学薬品株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 25.05.00	国際予備審査報告を作成した日 20.02.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 竹中靖典	2 J 9 5 0 7
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1-14

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: JP, 54-99494, A (日本油化工業株式会社) 6. 8月. 1979
(06. 08. 79)

文献2: JP, 06-160368, A (出光興産株式会社) 7. 6月. 1994
(07. 06. 94)

文献3: JP, 63-247656, A (マイルス・インコーポレーテッド) 14.
10月. 1988 (14. 10. 88)

請求項1-13について

文献1-3には、硫化水素又は硫化物イオンを含有する試料に、発色試薬を添加してその発色強度から、硫化水素又は硫化物イオン濃度を測定する方法が記載されているが、その際に金属イオン又は該金属イオンを遊離する化合物と、該金属イオンと反応して発色すると共に、その発色反応が前記硫化水素又は硫化物イオンによって阻害もしくは促進される金属指示薬を添加することについては記載されていない。

4-7
Translation

09/856790

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT-DK-2	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/06847	International filing date (day/month/year) 07 December 1999 (07.12.99)	Priority date (day/month/year) 07 December 1998 (07.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 31/00, C12Q 1/527		
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

RECEIVED
OCT 4 2000
TECHNOLOGY CENTER 1700

Date of submission of the demand 25 May 2000 (25.05.00)	Date of completion of this report 20 February 2001 (20.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06847

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

- These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/06847

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-14	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: JP, 54-99494, A (Nippon Yuka Kogyo K.K.), 6 August, 1979 (06.08.79)

Document 2: JP, 06-160368, A (Idemitsu Kosan Co., Ltd.), 7 June, 1994 (07.06.94)

Document 3: JP, 63-247656, A (Miles Incorporated), 14 October, 1988 (14.10.88)

Claims 1-13

Although documents 1-3 describe the method of determining the concentration of hydrogen sulfide or sulfide ion from the strength of coloration when a coloring reagent is added to a sample containing hydrogen sulfide or sulfide ion, they do not describe that in the above process, a metal ion or a compound to liberate the metal ion, and a metal indicator which reacts with the metal ion to undergo coloration and the coloration reaction of which is inhibited or promoted by the above-mentioned hydrogen sulfide or sulfide ion, are added.

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

MATSUI, Shigeru
7th floor
Ginza Todoroki Building
16-5, Ginza 8-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0061
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 15 June 2000 (15.06.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference PCT-DK-2			
International application No. PCT/JP99/06847	International filing date (day/month/year) 07 December 1999 (07.12.99)	Priority date (day/month/year) 07 December 1998 (07.12.98)	
Applicant DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
CN,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 15 June 2000 (15.06.00) under No. WO 00/34771

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colmbettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
---	---

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 20 July 2000 (20.07.00)	
International application No. PCT/JP99/06847	Applicant's or agent's file reference PCT-DK-2
International filing date (day/month/year) 07 December 1999 (07.12.99)	Priority date (day/month/year) 07 December 1998 (07.12.98)
Applicant EBINUMA, Hiroyuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
25 May 2000 (25.05.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Diana Nissen Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

F ENT COOPERATION TREA.

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MATSUI, Shigeru
Ginza Todoroki Building
2nd Floor
16-5, Ginza 8-chome
Chuo-ku
Tokyo 104-0061
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 07 November 2000 (07.11.00)	
Applicant's or agent's file reference PCT-DK-2	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP99/06847	International filing date (day/month/year) 07 December 1999 (07.12.99)

1. The following indications appeared on record concerning: <input type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative	
Name and Address MATSUI, Shigeru 7th floor Ginza Todoroki Building 16-5, Ginza 8-chome Chuo-ku Tokyo 104-0061 Japan	State of Nationality State of Residence
	Telephone No. 03-3542-2618
	Facsimile No. 03-3542-2619
	Teleprinter No.
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence	
Name and Address MATSUI, Shigeru Ginza Todoroki Building 2nd Floor 16-5, Ginza 8-chome Chuo-ku Tokyo 104-0061 Japan	State of Nationality State of Residence
	Telephone No. 03-3542-2618
	Facsimile No. 03-3542-2619
	Teleprinter No.
3. Further observations, if necessary:	
4. A copy of this notification has been sent to: <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other:	

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Shinji IGARASHI Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---